

Atty Dkt. No.  
32301WD205

#7  
**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicants: Brigitte BATHE, et al.

Group Art Unit: Unassigned

Serial No.: New

Examiner: Unassigned

Filed: August 31, 2001

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE *sigH* GENE

**CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY TRANSMITTAL**

ATTENTION: BOX MISSING PARTS  
Asst. Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of German Patent Appln. No. 100 43 333.2, filed in Germany on September 2, 2000.  
In support of this priority claim, Applicants submit herewith a certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,  
SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By: 

Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531  
1850 M Street, N.W. (Suite 800)  
Washington, D.C. 20036  
Telephone: (202) 659-2811  
Fax: (202) 263-4329

August 31, 2001

**PATENT**

11046 U.S. PTO  
09/942936  
08/31/01



J1046 U.S. PTO  
09/942936  
08/31/01

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 43 333.2

**Anmeldetag:** 02. September 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG,  
Düsseldorf/DE

**Erstanmelder:** DEGUSSA-HÜLS AKTIENGESELL-  
SCHAFT, Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das sigH-Gen kodierende Nukleotid-  
sequenzen

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust

### Neue für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigH-Gen verstärkt wird.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium*

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan  
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
30 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors H aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

20 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

25 coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das sigH-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor H kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigH-Gens aufweisen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
- 15 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor H kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
- 20 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 25 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
- 30 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem

Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene  
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors H und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und  
10 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur  
fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt  
15 aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die  
20 insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder  
25 mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein  
entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und  
30 gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke,

Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- 15 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

- 20 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-Faktor H kodierende *sigH*-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- Zur Isolierung des *sigH*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
- 25 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
  - 30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et



al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 5 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* 10 ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 15 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) 20 beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 25 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von 30 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *sigH* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No.

1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin  
wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben  
beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des  
entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die  
5 sich ergebende Aminosäuresequenz des sigH-Genproduktes  
dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch  
die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind  
ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind  
10 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID  
No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der  
Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche  
wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von  
Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als  
15 „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner  
grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins  
führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt,  
daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins  
dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar  
20 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann  
unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of  
Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene  
77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences  
3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology  
25 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der  
Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die  
sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind  
ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1  
30 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der  
Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der  
Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  
unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich  
aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
35 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
5 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit  
10 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die  
15 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x  
20 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter  
25 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine  
30 Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden,  
35 die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der

eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 5 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 10 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigH-Gens in verbesserter Weise 15 Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die 20 Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu 25 steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit 30 unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur

Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem *sigH*-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 15 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 20 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 25 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-

Dehydratase kodierende Allel *ilvA*(Fbr) (Möckel et al., (1994) *Molecular Microbiology* 13: 833-842),

- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
  - 5 • das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1973-1979),
  - das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)
  - 10 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
- Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sigH*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
  - das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
  - das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
  - 20 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigH*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).
- 25



Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

- 5 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- 10 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

- 15 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

### Beispiel 1

- 20 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

- Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
- 25
- 30

Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) 5 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. 10 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit 15 Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen 20 in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar 25 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des sigH-Gens

30 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

- Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- 5
- 10 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 15 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit
- 20 T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS
- 25 Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.
- Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-
- 30 Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems
- 35 (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"

5 Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die

10 Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1

15 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 621 Basenpaaren, welches als sigH-Gen bezeichnet wurde. Das sigH-Gen kodiert für ein Protein von 206 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; cccccc BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1148

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (302)..(919)

&lt;223&gt; sigH-Gen

25

&lt;400&gt; 1

ttgttgatgg ctgtggctaa atcatcgctca tctttggggc gtaatcgatg ccaaaatgcg 60

aggtcacggc gattagtctc aacaatttcg gtgcttaaag gatcctgcgg attattgacg 120

30

gtgaagtaga acattgtttc cccctagatt tgaagtggta catatgttct aactgatgtg 180

gtggacacgc gggggtagag taaagtctaa gcaacagctc acgtggcttt acagctaccc 240

35

ccgaaaggctc tgttttttat cggaagtaga atagtcaaca cgcattttcg aaaggggcca 300

c atg gct gaa aac cga acc ggc aca gtc gat gga gac gcg ttg gct gcc 349

Met Ala Glu Asn Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Asp Ala Leu Ala Ala

1

5

10

15

cgc ttt gaa gag gag gca ctg cca ctc ctt gac cag ctc tat ggc ggt 397

Arg Phe Glu Glu Glu Ala Leu Pro Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Gly Gly

20

25

30

gct ctg cgc atg act aga aat ccc gca gat gcg gaa gat ctc gtg caa 445

Ala Leu Arg Met Thr Arg Asn Pro Ala Asp Ala Glu Asp Leu Val Gln

35

40

45

gac acc tat atc aag gcg tac cag gcg ttc gcg agc ttc aaa cca ggc 493

Asp Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Gln Ala Phe Ala Ser Phe Lys Pro Gly

50

55

60

acc aac ctg aag gct tgg ctc tat cgg atc atg acg aat acc tac atc 541

Thr Asn Leu Lys Ala Trp Leu Tyr Arg Ile Met Thr Asn Thr Tyr Ile

55

65

70

75

80

aac atg tac cga aag aaa cag agg cag cca tcg caa acc tct gcc gat 589

Asn Met Tyr Arg Lys Lys Gln Arg Gln Pro Ser Gln Thr Ser Ala Asp

85

90

95

gag atc act gac tac cag ctc gtt gaa tct caa tcg cat acc tca aca 637  
 Glu Ile Thr Asp Tyr Gln Leu Val Glu Ser Gln Ser His Thr Ser Thr  
 100 105 110  
 5  
 ggg ctg gaa tcc gcc gag gtt gag gct ctg aaa aat ctg cca gac gga 685  
 Gly Leu Glu Ser Ala Glu Val Glu Ala Leu Lys Asn Leu Pro Asp Gly  
 115 120 125  
 10  
 aaa att ggc gat gca atg aat caa ctc agc ccg gaa tac cgg atg gtg 733  
 Lys Ile Gly Asp Ala Met Asn Gln Leu Ser Pro Glu Tyr Arg Met Val  
 130 135 140  
 15  
 gtt tat tat gcc gat gta gaa gat ctc gca tac aaa gaa atc gcc gag 781  
 Val Tyr Tyr Ala Asp Val Glu Asp Leu Ala Tyr Lys Glu Ile Ala Glu  
 145 150 155 160  
 20  
 atc atg gac gtt cca ctc gga act gtg atg tcc cga ctc cat cgt gga 829  
 Ile Met Asp Val Pro Leu Gly Thr Val Met Ser Arg Leu His Arg Gly  
 165 170 175  
 25  
 aga aaa cag ctc cga gga atg tta aag gaa gta gcg aag gaa caa ggc 877  
 Arg Lys Gln Leu Arg Gly Met Leu Lys Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly  
 180 185 190  
 30  
 att ggt ctt gaa cat ccc gac atg aag aaa aat tcg gag gca 919  
 Ile Gly Leu Glu His Pro Asp Met Lys Lys Asn Ser Glu Ala  
 195 200 205  
 35  
 taacgatgac gaatctcaac cgcagcgact cgcaaggatga ttgtggctgc cctgaattct 979  
 tcgatgaaat gtatcagcta ctcgacgatc aactcagcga gtccgcctgc gagcgtctgc 1039  
 ggattcacgc ggcaggctgc ccggcatgcc agcaactgct agaggccgaa tcggagtttc 1099  
 gtagtctgtt gcgcaagtgc tgctgcgaat cggcacctgt ggagctccg 1148  
 40  
 <210> 2  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 45  
 <400> 2  
 Met Ala Glu Asn Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Asp Ala Leu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Phe Glu Glu Glu Ala Leu Pro Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Gly Gly  
 20 25 30  
 50  
 Ala Leu Arg Met Thr Arg Asn Pro Ala Asp Ala Glu Asp Leu Val Gln  
 35 40 45  
 55  
 Asp Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Gln Ala Phe Ala Ser Phe Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 Thr Asn Leu Lys Ala Trp Leu Tyr Arg Ile Met Thr Asn Thr Tyr Ile  
 65 70 75 80



Asn Met Tyr Arg Lys Lys Gln Arg Gln Pro Ser Gln Thr Ser Ala Asp  
85 90 95

5 Glu Ile Thr Asp Tyr Gln Leu Val Glu Ser Gln Ser His Thr Ser Thr  
100 105 110

Gly Leu Glu Ser Ala Glu Val Glu Ala Leu Lys Asn Leu Pro Asp Gly  
115 120 125

10 Lys Ile Gly Asp Ala Met Asn Gln Leu Ser Pro Glu Tyr Arg Met Val  
130 135 140

Val Tyr Tyr Ala Asp Val Glu Asp Leu Ala Tyr Lys Glu Ile Ala Glu  
145 150 155 160

15 Ile Met Asp Val Pro Leu Gly Thr Val Met Ser Arg Leu His Arg Gly  
165 170 175

Arg Lys Gln Leu Arg Gly Met Leu Lys Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly  
180 185 190

20 Ile Gly Leu Glu His Pro Asp Met Lys Lys Asn Ser Glu Ala  
195 200 205

25

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das sigH-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-  
20 Faktors H aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend  
(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder

5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
(i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

10 6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von  
Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend  
höchstens 2x SSC durchgeführt wird

15 7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigH-Gen verstärkt,  
insbesondere überexprimiert wird.

20 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere Lysin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man folgende Schritte durchführt:

25 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das sigH-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
überexprimiert;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium  
oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich  
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-  
5 Aminosäure verstärkt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die  
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet  
10 sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure  
verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten  
15 Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sigH-  
Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),  
20 das (die) für das sigH-Gen kodiert (kodieren)  
verstärkt, insbesondere überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die regulatorischen Eigenschaften des  
25 Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das  
Polynukleotid sigH kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme  
30 Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende Gen dapA,

- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,
- 5 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 10 15.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 20 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 25 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme  
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
5 eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
kodierende Gen pck,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase  
kodierende Gen pgi,
- 10 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2  
abschwächt.
17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der  
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 15 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium  
einsetzt.
- 20 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um  
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene  
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor H kodieren oder  
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sigH-Gens  
aufweisen,
- 25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man das Polynukleotid, enthaltend die  
Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4  
als Hybridisierungs sonden einsetzt.

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigH-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungs sonden.